

**DIFERENCIACION DE *Babesia bovis* Y *Babesia bigemina* MEDIANTE EL USO DE UNA PRUEBA MOLECULAR EN ADN EXTRAIDO DE GARRAPATAS REPLETAS**

✉ **Julio Vicente Figueroa-Millán, José Juan Lira-Amaya, Diego Jesús Polanco-Martínez, Jesús Antonio Álvarez-Martínez, Carmen Rojas-Martínez, Carlos Ramón Bautista-Garfias.**

CENID-Parasitología Veterinaria, INIFAP. Carr. Fed. Cuernavaca-Cuautla No. 8534, Jiutepec, Morelos, CP 62550.

✉ Correo: figueroa.julio@inifap.gob.mx.

**RESUMEN.** El presente estudio tuvo como objetivo el uso de la prueba molecular PCR-RFLP para detectar y diferenciar la especie de *Babesia* presente en garrapatas *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, la garrapata común del ganado y la garrapata de la costa del Golfo, *Amblyomma maculatum*. La prueba de PCR amplificó una porción del gen 18S rDNA de aproximadamente 400 pb. Se generaron fragmentos de 250 y 150 pb en productos de PCR digeridos con la enzima de restricción *MspI*, solo en muestras conteniendo ADN de *B. bovis*, mientras que los amplicones de las muestras infectadas con *B. bigemina* no fueron digeridos. Los productos de PCR digeridos con *Box I* mostraron fragmentos de 290 y 110 pb en muestras infectadas solo con *B. bigemina*. La prueba de PCR-RFLP puede ser una herramienta molecular útil que permite detectar la presencia de *Babesia* spp. en garrapatas *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* y la discriminación de *B. bovis* y *B. bigemina*.

**Palabras clave:** *Babesia*, *Rhipicephalus microplus*, PCR-RFLP.

**Differentiation of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* using a molecular test in DNA extracted from engorged ticks**

**ABSTRACT:** This study aimed the use of a PCR-RFLP molecular test to detect and differentiate *Babesia* species present in ticks *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, the common cattle tick and the Gulf Coast Tick, *Amblyomma maculatum*. The PCR assay amplified a portion of the 18S rDNA gene of approximately 400 bp. Fragments of 250 and 150 bp were generated by enzyme digestion of PCR products with the restriction enzyme *Msp I*, only in samples containing DNA from *B. bovis*, while amplicons from samples infected with *B. bigemina* were not digested. PCR products digested with restriction enzyme *Box I* showed fragments of 290 and 110 bp in size only in samples infected with *B. bigemina*. The PCR-RFLP test can be a useful molecular tool to detect the presence of *Babesia* sp in *Rhipicephalus microplus* ticks and for discrimination of *B. bovis* from *B. bigemina*.

**Key words:** *Babesia*, *Rhipicephalus microplus*, PCR-RFLP.

**INTRODUCCIÓN**

Las garrapatas son parásitos hematófagos obligados así como los vectores más importantes de diferentes patógenos en animales domésticos y silvestres (Jongejan y Uilenberg, 2004). En México la garrapata común del ganado, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* ha sido reconocida como uno de los vectores que transmiten la babesiosis bovina, una enfermedad causada por los parásitos intraeritrocíticos *Babesia bovis* y *Babesia bigemina*, que se caracteriza por provocar una alta morbilidad, con la presencia de fiebre, anemia hemolítica, hemoglobinuria, ictericia y frecuentemente la muerte (Figueroa y Álvarez, 2003; OIE, 2004). Actualmente en el país se tiene escasa o nula información sobre la transmisión de *B. bovis* y *B. bigemina* por parte de la garrapata de la costa del Golfo, *Amblyomma maculatum* (Quiroz, 1984). Estudios realizados

recientemente demuestran la presencia de esta especie de garrapatas en bovinos, además de pequeños rumiantes como se ha descrito anteriormente (Álvarez *et al.*, 2003; Lira *et al.*, 2014).

La ganadería bovina en México asciende a más de 32 millones de cabezas (SIAP, 2010) de las cuales el 70% se desarrolla en regiones tropicales y subtropicales, lugares de alta incidencia de la garrapata vector (Navarrete *et al.*, 2002). El diagnóstico de la enfermedad se basa en la presentación de signos clínicos asociados a la presencia de la garrapata vector; sin embargo, se requiere de pruebas de laboratorio para confirmar la presencia de los parásitos intraeritrocíticos (OIE, 2004). El método tradicionalmente utilizado para la identificación del agente en animales infectados es mediante el examen microscópico de frotis finos y gruesos de sangre, teñidos con colorante de Giemsa. Es un método adecuado para la diferenciación de especies (basada en el tamaño y características morfológicas de *B. bovis* o *B. bigemina*) en los bovinos infectados, particularmente en la detección de infecciones agudas y es buena en frotis finos pero pobre en los frotis gruesos (OIE, 2004).

Se ha mencionado que para el estudio de la epidemiología de la babesiosis bovina y el establecimiento de programas adecuados de prevención y control de la enfermedad, no solo se necesita saber la prevalencia de la enfermedad en los animales huéspedes, sino que es primordial conocer el grado de infestación por garrapatas en los bovinos, así como también la prevalencia e intensidad de infección de las garrapatas por *Babesia* (Guglielmone, 1995).

Desde los años 60's se ha descrito que la infección por *B. bovis* y *B. bigemina* en hembras repletas de *R. microplus* puede ser detectada mediante microscopía óptica a partir de una muestra de hemolinfa (Riek, 1964, 1966). Esta prueba permite identificar la fase evolutiva de *Babesia* denominada quinetos y, con base en la longitud y otras características morfológicas de estos, se ha postulado que se puede diferenciar *B. bovis* de *B. bigemina* (Riek, 1964, 1966; Johnston, 1967). Sin embargo, otros autores señalan que no siempre es posible discernir la especie de *Babesia* que infecta a las garrapatas *R. microplus* solamente con base en el análisis morfológico de los quinetos en una muestra de hemolinfa (Buscher, 1988; Guglielmone *et al.*, 1989, 1995). Por otro lado, se ha señalado que el método convencional actualmente disponible, tal como el examen microscópico de una muestra de hemolinfa teñida con Giemsa, tiene algunas limitaciones debido a la baja sensibilidad analítica, exigencia de un microscopista capacitado para identificar y diferenciar las especies involucradas, y bajo rendimiento en cuanto al número de muestras analizadas en una jornada (Figuroa y Buening, 1995; Sparagano *et al.*, 1999). Las pruebas diagnósticas modernas basadas en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) tienen una elevada sensibilidad y especificidad analítica y son susceptibles de brindar un alto rendimiento (Figuroa y Buening, 1995; Figuroa y Álvarez, 2003; Oliveira *et al.*, 2005). En la mayoría de estos métodos se requiere, sin embargo, una prueba de PCR por especie y en ocasiones dos pruebas de PCR por especie si se realiza una re-amplificación de ADN con el método de PCR anidado.

El objetivo de este trabajo estuvo dirigido a poner a punto una prueba de PCR para *Babesia* spp., basada en oligonucleótidos género-específicos que amplifican una porción del gen DNA ribosomal 18S de cualquier especie de *Babesia*, así como en la determinación de especie mediante digestión del producto de amplificación con enzimas de restricción (PCR-RFLP) y su aplicación preliminar en la detección de *B. bovis*, *B. bigemina* o ambas especies en *R. microplus* y en *Amblyomma maculatum*.

## **MATERIALES Y MÉTODO**

Con el objeto de poner a punto la prueba de PCR-RFLP (Reacción en Cadena de la Polimerasa-Análisis del polimorfismo en longitud de fragmentos con enzimas de restricción), se

obtuvieron glóbulos rojos infectados con *B. bovis* y *B. bigemina* a partir de 9 diferentes aislados de cada especie (Pérez *et al.*, 2010; Figueroa *et al.*, 2013). Además, se seleccionaron 10 garrapatas hembras ingurgitadas en bovinos experimentalmente infectados con *B. bovis* y *B. bigemina* y positivas a la prueba de hemolinfa (Castañeda *et al.*, 2012), y se incluyeron también 10 garrapatas ingurgitadas de la especie *Amblyomma maculatum*. La extracción del DNA genómico de *Babesia* spp. se realizó mediante el procedimiento de purificación por columnas con la utilización de un kit comercial. Para la prueba de PCR se procedió a la amplificación de la porción variable del gen que codifica para el ARN ribosomal de la pequeña subunidad 18S, utilizando los oligonucleótidos PIRO A y PIRO B (Carret *et al.*, 1999) y que amplifican diferentes especies de *Babesia* (Carret, 1999). Las reacciones de PCR se realizaron en tubos de 0.2 ml, con un volumen final de 25µl, a los cuales se agregaron 12.5µl de mezcla maestra (*Taq* polimerasa, dNTPs, Mg<sub>2</sub>Cl), 5.5µl de agua libre de nucleasas, 5µl de ADN purificado (conteniendo 100 ng) y 2 µl de mezcla de los oligonucleótidos sentido PIRO A (5'-AATACCCAATCCTGACACAGGG-3') y anti-sentido PIRO B (5'-TTAAATACGAATGCCCAAC-3') (Carret *et al.*, 1999).

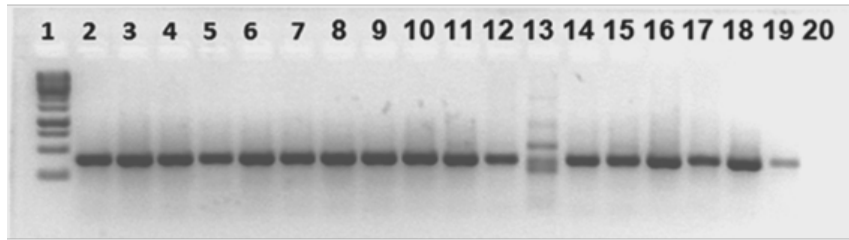
La reacción de amplificación se realizó con el siguiente protocolo de ciclado: un ciclo de desnaturalización inicial por 5 min a 94°C, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 1 min, alineamiento a 55°C por 1 min, extensión a 72°C por 1 min, extensión final a 72°C por 5 min y conservación a 4°C hasta retiro de los tubos de PCR para análisis de las muestras. El producto amplificado por PCR con los oligonucleótidos PIRO A/B, se sometió a digestión con las enzimas de restricción (ER) *Msp* I y *Box* I, de acuerdo a las especificaciones del proveedor. Con base en un análisis bioinformático realizado con la secuencia de ADN ribosomal de cada especie de *Babesia*, se identificó un sitio de reconocimiento para cada una de estas enzimas en la parte variable del gen ADNr del parásito. En teoría, la ER *Box* I (secuencia de reconocimiento 5'-GACNN↓NNGTC-3') cortaría solamente el amplicón correspondiente al DNA ribosomal de *B. bigemina*, mientras que la ER *Msp* I (sitio de reconocimiento 5'-C↓CGG-3') cortaría solamente el amplicón correspondiente al DNA ribosomal de *B. bovis*.

De acuerdo a la cantidad de ADN amplificado y necesitado para cada digestión con las ER, el volumen final de reacción fue de 31µl, agregando 10µl de producto de PCR, 18µl de agua libre de nucleasas, 2µl de buffer 10X, 1µl de ER conteniendo 10 Unidades de *Msp* I ó *Box* I. La digestión con las ER se llevó a cabo en un baño maría a 37°C durante 16 hrs. Los productos de PCR y los derivados de la digestión con ER se visualizaron por electroforesis horizontal en geles de agarosa al 2-3% en buffer TAE 1X y teñidos con 1.5µl de bromuro de etidio (10 mg/ml). Se utilizaron marcadores moleculares de 100 pb (pares de bases) para discernir y estimar el tamaño de los amplicones y los productos de digestión enzimática. Para esto, del producto obtenido por PCR se colocaron 24 µl de la reacción en cada pozo y se sometieron a electroforesis a 85 voltios con buffer de corrimiento (TAE 1X) y el gel se visualizó en un transluminador con luz ultravioleta.

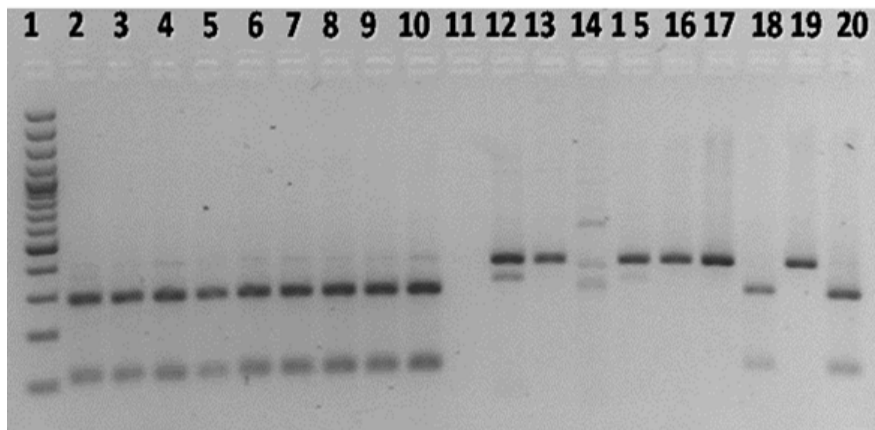
## RESULTADOS

Con el objeto de implementar una prueba para la detección y diferenciación del agente etiológico de la babesiosis bovina en garrapatas, se puso a punto un procedimiento que consiste en la amplificación de ADN de *Babesia* spp. por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y el análisis del polimorfismo en longitud de fragmentos con enzimas de restricción (RFLP).

### A) PCR



### B) RFLP con enzima *Box I*



### C) RFLP con enzima *Msp I*

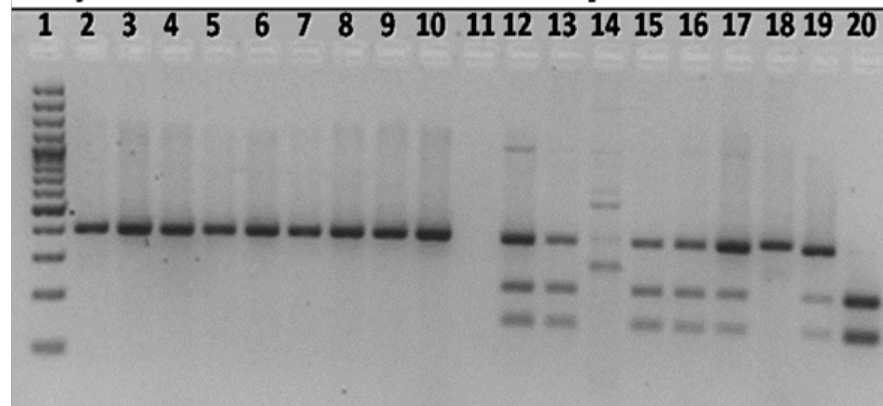


Figura 1. Prueba de PCR-RFLP. Identificación: Carril 1) Marcador de 100 pb; Carriles 2-9: Aislados clasificados como *B. bovis*; Carriles 12-20: Aislados clasificados como *B. bigemina*. Panel A: Resultados de amplificación por PCR con oligonucleótidos PIRO A/B); Panel B: Resultado PCR-RFLP con amplicones digeridos con *Box I*; Panel C: Resultado PCR-RFLP con amplicones digeridos con *Msp I*.

La prueba de PCR amplifica un fragmento de aproximadamente 400 pb, en *B. bovis* y *B. bigemina* de los distintos aislados geográficos. La Figura 1 muestra el resultado representativo de los amplicones obtenidos en la prueba de PCR y sujetos a digestión enzimática (RFLP) en las

muestras derivadas de 18 distintos aislados geográficos (9 clasificados como *B. bovis* y 9 clasificados como *B. bigemina*). Si el amplicón obtenido se digiere con la ER *Box I*, se obtienen 2 fragmentos de  $\approx 290$  y 110 pb en las muestras infectadas solamente con *B. bigemina*, mientras que en las muestras infectadas con *B. bovis* el amplicón de 400 pb no se digiere, salvo si estuviese la muestra co-infectada (Figura 1, carril 18 y 20). Si el amplicón obtenido se digiere con la ER *Msp I*, se obtienen fragmentos de 400 pb,  $\approx 250$  y 150 pb de longitud (RFLP) en las muestras que contienen solamente *B. bovis* (denotándose una digestión parcial en la mayoría de las muestras clasificadas como *B. bovis*), mientras que en las muestras infectadas con *B. bigemina* el amplicón no es digerido, diferenciándose así la especie infectante mediante el patrón de restricción (PCR-RFLP). Además, si los amplicones derivados de PCR a partir de una muestra co-infectada con *B. bovis* y *B. bigemina* son digeridos con la ER *Box I* se obtienen las bandas de 290 y 110 pb, mientras que en la muestra digerida con la ER *Msp I* se observan fragmentos de 250 y 150 pb, diferenciándose las especies presentes en las muestras co-infectadas con *B. bovis* y *B. bigemina* (Figura 1, carril 20).

La prueba de PCR practicada en las 10 muestras procesadas de garrapatas *R. microplus* permitió identificar a los 10 especímenes con amplicones de la talla esperada (400 pb). Sin embargo, solo en 6 especímenes se pudo visualizar una banda intensa (no mostrado). La digestión enzimática con las ER *Box I* y *Msp I* de los amplicones obtenidos permitió identificar un patrón correspondiente a *B. bigemina* en 5 de las garrapatas y un patrón correspondiente a *B. bovis* en 3 garrapatas, con una infección mixta en 2 garrapatas (no mostrado). En las 10 muestras restantes que fueron analizadas y que corresponden a las garrapatas *A. maculatum* no se identificaron fragmentos de la talla esperada que pudieran indicar la presencia de *Babesia* spp. (no mostrado).

## DISCUSIÓN

Se logró implementar la prueba de PCR para detectar *Babesia* spp. en el ADN extraído a partir de los eritrocitos infectados con 18 distintos aislados geográficos de *B. bigemina* y *B. bovis*. Mediante el uso de oligonucleótidos genéricos que alinean al gen que codifica por el ARN ribosomal 18S, la prueba de PCR logra detectar la presencia de *B. bigemina* y/o *B. bovis* en muestras de campo, demostrándose así la conservación del gen 18S ADN ribosomal en las especies de *Babesia* en México. Además, y aun cuando solamente se evaluó la prueba en un reducido número de garrapatas *R. microplus* alimentadas en animales experimentalmente infectados con *Babesia bovis* o *B. bigemina*, estas pudieron ser identificadas como tales. Cabe mencionar que actualmente no se ha demostrado si la garrapata *A. maculatum* se encuentra involucrada en la transmisión de la babesiosis bovina, sin embargo estudios recientes demuestran que además de pequeños rumiantes, también puede parasitar al ganado bovino (Álvarez *et al.*, 2003). En todo caso su inclusión en este trabajo permitió manejarlas como garrapatas negativas realmente no infectadas y demostrar, en parte, la especificidad de la prueba de PCR utilizada.

Trabajos previamente realizados utilizaron como molde DNA purificado a partir de parásitos cultivados *in vitro* (Carret, 1999; Carret *et al.*, 1999), obteniéndose un amplicón de la talla esperada pero sin poder diferenciarse la especie: *B. bovis* o *B. bigemina*, dado que no se realizó proceso de digestión enzimática alguno. La prueba de PCR-RFLP utilizada como técnica para la detección directa puede ser precisa y confiable, cuando se compare con la prueba de microscopía óptica. Sin embargo, es necesario evaluar un mayor número de muestras de garrapatas provenientes de animales infectados y no infectados con *Babesia* sp., para poder determinar su sensibilidad analítica y especificidad diagnóstica, en comparación con la prueba convencional. No obstante, se puede argumentar que es en términos de la especificidad de las pruebas y de la cantidad de muestras que pueden ser procesadas en un día por un solo analista,

donde se podrán establecer claras diferencias entre las pruebas diagnósticas directas. Por ejemplo, un microscopista puede analizar fácilmente 30 muestras de hemolinfa en una jornada si se le dedica aproximadamente 10-15 minutos de análisis microscópico. Sin embargo, para lograr esto se necesita contar con una persona con experiencia para la detección e identificación de los parásitos. Por otro lado la prueba de PCR si bien es una técnica de elevado costo por los reactivos que utiliza, tiene la gran ventaja que en una jornada laboral de 8 hrs, y dada la (semi) automatización del procedimiento de amplificación del ADN, se puede tener un mayor número de muestras procesadas en un día (en nuestra experiencia, al menos 100 muestras).

Actualmente se están realizando los experimentos necesarios para determinar, con el uso de la prueba basada en PCR-RFLP, las tasas e intensidades de infección por *Babesia* en garrapatas experimental y naturalmente infectadas con *B. bovis* y/o *B. bigemina*. Este es el primer trabajo en México que permite realizar una diferenciación de las especies *B. bovis* y/o *B. bigemina* con el uso de enzimas de restricción para digestión de un amplicón obtenido por PCR a partir de muestras de eritrocitos de bovino y garrapatas infectadas con *Babesia* sp. La prueba puede ser implementada para el monitoreo de infección por *Babesia* spp. en la fase aguda de la enfermedad en bovinos de tal forma que se pueda estimar el período prepatente y/o patente de la infección en animales premunizados y/o naturalmente infectados. Una prueba de diagnóstico más sensible y específica de especie, como la prueba de PCR-RFLP, es instrumental para la detección y diferenciación de *B. bovis* y *B. bigemina*, ya que permite analizar alrededor de 100 muestras en una jornada laboral y facilita el establecimiento de una intervención médica más efectiva y oportuna para el tratamiento de la babesiosis bovina.

## CONCLUSIÓN.

La prueba de PCR-RFLP desarrollada podría ser aplicada en cualquier parte del país en donde existan laboratorios con equipamiento básico para la prueba de PCR, donde se requiera un diagnóstico más preciso de la babesiosis, incluyendo estudios epidemiológicos para estimación de la prevalencia e intensidad de infección, tanto en bovinos como en garrapatas. La prueba puede utilizarse también en la detección de infección mixta en bovinos, así como en la identificación y diferenciación de *Babesia* sp. en la garrapata *R. microplus* y eventualmente, en *R. annulatus*, la segunda especie de garrapata común del ganado existente en México

## LITERATURA CITADA

- Alvarez, V., Bonilla, R., y I. Chacón. 2003. Abundancia relativa de *Amblyomma* spp. (Acari: Ixodidae) en bovinos (*Bos taurus* y *B. indicus*) de Costa Rica. *Revista de Biología Tropical*. 51(2): 435-444.
- Buscher, G. 1988. The infection of various tick species with *Babesia bigemina*, its transmission and identification. *Parasitology Research*. 74:324-330.
- Carret, C.M. 1999. *Babesia canis*: caractérisation d'antigènes parasitaires solubles potentiellement impliqués dans l'immunoprotection induite chez le chien et analyse moléculaire du polymorphisme génétique des sous espèces. Tesis de doctorado. Facultad de Farmacia, Universidad de Montpellier I. Montpellier, Francia.
- Carret, C., Walas, F., Carcy, B., Grande, N., Précigout, É., Moubri, K., Schetters, T.P. and A. Gorenflot. 1999. *Babesia canis canis*, *Babesia canis vogeli*, *Babesia canis rossi*: Differentiation of the three subspecies by a Restriction Fragment Length Polymorphism analysis on amplified small subunit ribosomal RNA genes. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 46(3): 298-303.

- Castañeda-Arriola, R.O., Rojas-Martínez, C., Figueroa-Millán, J.V., Martínez-Ibáñez, F. y J.A. Álvarez-Martínez. 2012. Uso de PCR anidada para determinación de infección por *Babesia* spp en garrapatas *Boophilus (Rhipicephalus) microplus*. Acarología Latinoamericana, 1er Congreso Latinoamericano de Acarología 2012. Sociedad Mexicana de Entomología A.C., Primera Ed 2012. pp. 176-180.
- Figueroa, J.V. and G.M. Buening. 1995. Nucleic acid probes as a diagnostic method for tick-borne hemoparasites of veterinary importance. *Veterinary Parasitology*. 75: 75-92.
- Figueroa, J.V. y J.A. Álvarez. 2003. Investigaciones sobre la aplicación de técnicas moleculares en el diagnóstico y control de la babesiosis bovina. *Ciencia Veterinaria*. 9: 75-103.
- Figueroa, M.J.V., Pérez, S.J., Vargas, U.P., Rojas, M.C. y J.A. Álvarez, M. 2013. Clonación y secuenciación de rap-1a a partir de aislados mexicanos de *Babesia bigemina*. XXXVII Congreso Nacional de Buiatría, 1-3 de agosto, 2013. Acapulco, Gro. pp. 618-624.
- Guglielmone, A.A. 1995. Epidemiology of babesiosis and anaplasmosis in South and Central America. *Veterinary Parasitology*. 57: 109-119.
- Guglielmone, A.A., Mangold, A.J., Aguirre, D.H., Gaido, A.B. and A.A de Olsen. 1989. The effect of infection by *Babesia* sp. on some biological parameters of engorged females of *Boophilus microplus*. *Folia Parasitologica*. 36: 1-6.
- Guglielmone, A.A., Gaido, A.B. and A.J. Mangold. 1995. Light microscopy diagnosis of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* kinetes in the haemolymph of artificially infected *Boophilus microplus* engorged female ticks. *Veterinary Parasitology*. 61: 15-20.
- Jongejan, F. and G. Uilenberg. 2004. The global importance of ticks. *Parasitology*. 129 (Suppl): S3-S14.
- Johnston, L.A.Y. 1967. Epidemiology of bovine babesiosis in Northern Queensland. *Australian Veterinary Journal*. 43: 427-432.
- Lira, A.J.J., Ojeda, R.N.D., Martínez, I.F., Álvarez, M.J.A., Rojas, M.C., Vargas, U.P., Bautista, G.C.R., Pérez, R.J.J. y J.V. Figueroa. 2014. Detección molecular de parásitos hemotrópicos en un rebaño de ovejas del Estado de Tabasco. Memorias del XXXVIII Congreso Nacional de Buiatría. 1-3 de agosto, 2014. Villahermosa, Tab. pp. 261-267.
- Navarrete, I., Serrano, F.J. y D. Reina. 2002. Parásitos hemáticos. En: M. Cordero del Campillo y R.A. Rojas-Vazquez, Eds. *Parasitología Veterinaria*. España: Mc Graw Hill. pp. 283-294.
- OIE. 2004. Babesiosis bovina. En: *Manual de la OIE sobre animales terrestres 2004*. Capítulo 2.3.8. pp. 548-559.
- Oliveira, M.C.S., Oliveira-Sequeira, T.C.G., Araujo Jr., J.P., Amarante, A.F.T. and H.N. Oliveira. 2005. *Babesia* spp infection in *Boophilus microplus* engorged females and eggs in Sao Paulo State, Brazil. *Veterinary Parasitology*. 130: 61-67.
- Pérez, J., Perez, J.J., Vargas, P., Álvarez, J.A., Rojas, C. and J.V. Figueroa. 2010. Sequence conservation of 12D3 gene in Mexican isolates of *B. bovis*. *Transboundary and Emerging Diseases*. 57: 57-60.
- Quiroz, R.H. 1984. Babesiosis en ovinos y caprinos. En: *Parasitología y enfermedades parasitarias de animales domésticos*. 1ª Ed. Editorial Limusa, México.
- Riek, R.F. 1964. The life cycle of *Babesia bigemina* (Smith & Kilborne, 1893) in the tick vector *Boophilus microplus* (Canestrini). *Australian Journal of Agricultural Research*. 15: 802-821.
- Riek, R.F. 1966. The life cycle of *Babesia argentina* (Lignieres, 1903) (Sporozoa, Piroplasmidae) in the tick vector *Boophilus microplus* (Canestrini). *Australian Journal of Agricultural Research*. 17: 247-254.

- Sparagano, O.A.E., Allsopp, M.T.E.P., Mank, R.A., Rijpkema, S.G.T., Figuroa, J.V. and F. Jongejan. 1999. Molecular detection of pathogen DNA in ticks (Acari: Ixodidae): A review. *Experimental and Applied Acarology*. 23(12): 929-960.
- SIAP - SAGARPA. Bovino Carne y Leche, Población ganadera 2004 - 2013. [http://www.siap.gob.mx/opt/poblagand/Bovinos\\_carne\\_leche.pdf](http://www.siap.gob.mx/opt/poblagand/Bovinos_carne_leche.pdf) [Accesado: 26 Septiembre 2014].